

別表5
(3)

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	藤原 千明
主 論 文 題 名 :				
テロメア阻害剤の新規作用点の同定とその感受性規定因子に関する研究				
【序論】 テロメア DNA は、TTAGGG の繰り返し配列として、染色体末端に位置する。テロメアは、正常体細胞において細胞分裂のたびに短縮する。テロメアが一定以下の短さになると、細胞老化や細胞死が誘導される。テロメアを伸長する機構は、二種類存在する。一つ目は、逆転写酵素テロメラーゼにより、染色体末端にテロメア DNA を付加する。二つ目は、相同組換えによるものである。この二つのテロメア伸長機構は、がん細胞の不死化を可能にする。 タンキラーゼは、poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) であり、標的タンパク質を poly (ADP-ribosyl) ation (PAR 化) する。テロメア上には種々のタンパク質が存在し、そのうち telomeric repeat-binding factor 1 (TRF1) は、テロメアの伸長を抑制する。TRF1 はタンキラーゼにより PAR 化を受け、ユビキチン分解へと導かれる。その結果、テロメアが伸長する。 本研究では、テロメア伸長に関わる二つの因子テロメラーゼ、タンキラーゼに着目し、各々の阻害薬の新規作用点の同定と、その感受性規定因子の解析を行った。 本研究は以下の 2 部よりなる。 第 1 部 テロメラーゼ阻害剤 MST-312 の制がん効果を規定する因子 第 2 部 タンキラーゼ阻害剤の感受性規定因子の同定 <u>第 1 部 テロメラーゼ阻害剤 MST-312 の制がん効果を規定する因子</u> 【第 1 部：背景と目的】 テロメラーゼは、主に触媒サブユニットの telomerase reverse transcriptase (TERT) と、テロメアの鋳型 RNA の telomerase RNA template component (TERC) からなる複合体である。 MST-312 は、テロメラーゼ阻害活性を有する化合物として創製された。先行実験者らは、テロメラーゼ陽性のがん細胞に対して、MST-312 を亜致死濃度で長期処理した。その結果、MST-312 はテロメア伸長抑制効果を示した。また、先行実験者らは、ヒトがん細胞パネル JFCR39 を用い、MST-312 の感受性と相関する薬剤の探索 (COMPARE 解析) を行った。MST-312 の感受性は、DNA トポイソメラーゼ II 阻害効果を持つ薬剤の感受性パターンと類似していた。その後、MST-312 は、トポイソメラーゼ II を阻害することが明らかになった。更に、MST-312 の感受性と相関する細胞因子の探索 (BIO-COMPARE 解析) を行った。その結果、MST-312 の感受性は、テロメア長と、核膜の裏打ちタンパク質 lamin A の発現量に逆相関することが明らかとなった。一方、MST-312 の感受性はテロメラーゼ活性とは相関しなかった。 第 1 部では、MST-312 による DNA 傷害や細胞死に対して、テロメア長と lamin A が及ぼす影響を検討した。これにより MST-312 の効果に影響を与える因子を明らかにすることを目的とした。また、lamin A をコードする遺伝子 LMNA は、lamin C も選択的スプライシング産物としてもつ。Lamin A は 664 アミノ酸、lamin C は 572 アミノ酸からなり、N 末端の 566 アミノ酸は共通である。ここでは、MST-312 による DNA 傷害に対して、lamin C が与える影響も検討した。				

【第1部：方法】

・用いた細胞

ヒト肺がん細胞株 NCI-H522 は、MST-312 に高感受性であり、テロメアが短く、lamin A の発現が低い。先行実験者らは、NCI-H522 に対し、hTERT と lamin A を単独で、あるいは双方を強制発現させた細胞株を樹立した。以下、H522/mock 細胞、H522/lamin A 細胞、H522/hTERT 細胞、H522/lamin A+hTERT 細胞、と称し、実験に用いた。先行実験者らにより、H522/hTERT 細胞と H522/lamin A+hTERT 細胞でのテロメア伸長は確認している。

・Immuno-fluorescence in situ hybridization (FISH)

6-well プレートにカバースリップを入れ、H522/mock 細胞、H522/lamin A 細胞、H522/hTERT 細胞、H522/lamin A+hTERT 細胞を播種した。細胞には、5 μ M の MST-312 あるいは dimethyl sulfoxide (DMSO) を処理し、48 時間培養した。細胞は 2% paraformaldehyde で固定した。1 次抗体として、anti-53BP1 antibody を用いて染色した。その後、ヒトテロメア配列に相補的な特異的配列を持つ Cy3 標識 peptide nucleic acid (PNA) プローブを、83°C で 4 分間ハイブリダイズさせた。調整した細胞は、蛍光顕微鏡で観察した。53BP1 foci の数が、1 つの細胞において 4 個以上の細胞を DNA 損傷が陽性の細胞と定義した。53BP1 foci と PNA プローブ foci の重なりが、1 つの細胞において 4 個以上の細胞を、テロメア上の DNA 損傷が陽性の細胞と定義した。

・細胞周期の測定

H522/mock 細胞、H522/lamin A 細胞、H522/hTERT 細胞、H522/lamin A+hTERT 細胞を MST-312、cisplatin、camptothecin、etoposide、paclitaxel で処理した。96 時間培養後、最終濃度 50 μ g/mL の propidium iodide を細胞に染色した。フローサイトメトリーを用いて染色した細胞の sub G1 画分を計測した。

・Lamin C 発現 plasmid の作製

A549 細胞の全 RNA を抽出し、cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型とし、lamin C の cDNA を増幅した。増幅した cDNA は、pLNCX2 ベクターに挿入し、pLNCX2-lamin C plasmid とした。

【第1部：結果】

MST-312 による DNA 損傷の定量化

MST-312 による DNA 損傷が陽性となる細胞の割合は、H522/mock 細胞で 76%、H522/lamin A 細胞で 28%、H522/hTERT 細胞で 54%、H522/lamin A+hTERT 細胞で 19% であった。また、テロメア上の DNA 損傷が陽性となる細胞の割合は、H522/mock 細胞で 63%、H522/lamin A 細胞で 37%、H522/hTERT 細胞で 14%、H522/lamin A+hTERT 細胞で 4% であった。

DNA 傷害性抗がん剤による細胞死の解析

MST-312 処理時の sub G1 画分は、H522/mock 細胞に比べて、H522/lamin A 細胞、H522/hTERT 細胞、H522/lamin A+hTERT 細胞いずれにおいても減少していた。これが MST-312 特有の現象なのかを確認するため、DNA 傷害性薬剤である cisplatin (3.3 μ M)、camptothecin (10 μ M)、etoposide (1.6 μ M) と、微小管脱重合阻害剤である paclitaxel (5 nM) をそれぞれ 96 時間処理した。その結果、DNA 傷害性薬剤を処理時にも、H522/lamin A 細胞、H522/hTERT 細胞、H522/lamin A+hTERT 細胞において、H522/mock 細胞と比較して sub G1 画分が減少した。一方で、paclitaxel 処理時には、各細胞株の間で sub G1 画分の割合に変化は認められなかった。これより、H522/lamin A 細胞、H522/hTERT 細胞、H522/lamin A+hTERT 細胞は、MST-312 を含め、種々の DNA 傷害性薬剤に対して抵抗性になることが明らかになった。

MST-312 による DNA 損傷に lamin C が与える影響

NCI-H522 細胞に対し、空ベクターまたは pLNCX2-lamin C plasmid を一過性に導入し、H522/pLNCX2 細胞、H522/lamin C 細胞とした。これらの細胞に対して MST-312 (5 μ M) を 48 時間処理し、免疫蛍光染色を行った。その結果、MST-312 による DNA 損傷が陽性となる細胞の割合は、H522/pLNCX2 細胞と H522/lamin C 細胞の間に変化は認められなかった。

【第1部：考察と結論】

先行実験者らの検討によると、H522/hTERT 細胞と H522/lamin A+hTERT 細胞において、テロメアが伸長していることを確認している。そのため、H522/hTERT 細胞と H522/lamin A+hTERT 細胞における DNA 傷害抵抗性は、1) hTERT による効果と、2) テロメア長による効果が考えられる。1) について、hTERT の過剰発現は、放射線照射あるいは etoposide 処理による DNA 損傷誘導性のアポトーシスを抑制するという報告がある。2) について、テロメラーゼ阻害剤 imetelstat を肺癌細胞株 63 種類に処理すると、テロメア長が短いほど感受性が強くなるという報告がある。H522/lamin A 細胞における DNA 傷害抵抗性に関しては、lamin A を強制発現した卵巣がん細胞で免疫蛍光染色を行うと、陰性対照株と比較して、 γ -H2AX の foci が減少する報告がある。これらの報告は、第1部の研究と関わりがある可能性がある。

第1部の研究より、hTERT の発現と lamin A の発現は、テロメアが短く、lamin A の発現が低い細胞に対して DNA 傷害に対する抵抗性を付与することが明らかになった。

第2部 タンキラーゼ阻害剤の感受性規定因子の同定

【第2部：背景と目的】

タンキラーゼは、様々なタンパク質を基質にもつ。その中のひとつに、Axin がある。タンキラーゼは、Axin を PAR 化し、ユビキチン分解へと導くことで、発がんおよび腫瘍の増殖に関与する Wnt/ β -catenin 経路を促進する。そのため、タンキラーゼ阻害剤は、Wnt/ β -catenin 経路に依存する大腸がん細胞の増殖を抑制する。しかし限られた大腸がんではしか効果を示さず、がん治療薬として臨床応用されるには至っていない。

そこで第2部では、shRNA ライブラリースクリーニングを用いて、タンキラーゼ阻害剤の感受性規定因子を同定することを目的とした。

【第2部：方法】

・ shRNA ライブラリー探索

シグナル伝達経路に関わる 5,043 種類の遺伝子の mRNA を標的とし、1 遺伝子につき 4~6 種類の shRNA が設計された shRNA ライブラリー (Cellecra DECIPHER Pooled Lentiviral shRNA Libraries) を用いた。クローン化したヒト子宮頸がん HeLa I.2.11 clone#2 細胞 (以下、HeLa 細胞と称する) に、レンチウイルスベクターを用いて shRNA ライブラリーを感染させた。shRNA ライブラリーを組み込んだ細胞に対し、DMSO もしくはタンキラーゼ阻害剤 G007-LK 3 μ M を 8 日間処理し細胞を回収した。更に、ゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる受託解析へと進めた。候補遺伝子の検証には、HeLa 細胞と、タンキラーゼ阻害剤感受性大腸がん細胞である COLO-320DM 細胞を用いた。また、COLO-320DM 細胞では、他のタンキラーゼ阻害剤 IWR-1 での検討も行った。

・ 遺伝子 X の shRNA 導入細胞株の樹立

遺伝子 X の mRNA 上の異なる配列を標的とした shRNA plasmid を、shGeneX #1~#3 plasmid の合計 3 種類作製した。陰性対照として、scramble shRNA plasmid を用いた。これらはレンチウイルスベクターにより各細胞株に導入し、それぞれ scramble shRNA 株、shGeneX #1~#3 株とした。

・ 細胞増殖阻害試験

各細胞を 96-well プレートに播種後、翌日に薬剤を処理した。5 日間培養後、1 mg/mL の 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution を加え 4 時間培養した。その後、培地を除いて 100 μ L の DMSO を添加し 1 時間後に 570 nm および 630 nm の吸光度を測定した。

・ *in vivo* xenograft 試験

ヒト大腸がん COLO-320DM 細胞の scramble shRNA 株を陰性対照として用い、sh*GeneX* #3 株との 2 群に分けた。更にそれぞれの群を vehicle 投与群と G007-LK 投与群の 2 群に分けた計 4 群を試験対象とした。細胞は、 5×10^6 cells/100 μ L/匹 (1 群あたり n=5) ずつ、5 週齢の NOD/SCID マウスの右脇腹に皮下注射により移植した。移植より 12 日後から腹腔内注射により薬剤 (G007-LK 30 mg/kg) 投与を開始した。Vehicle 投与群には G007-LK 投与群と同体積の vehicle を投与した。薬剤は、1 日 1 回投薬で 5 日間の連投 (QD \times 5) \rightarrow 2 日間の休薬 \rightarrow QD \times 5 のスケジュールで投与した。

【第 2 部：結果】

(1) shRNA ライブラリースクリーニングにより得られた遺伝子の検証

shRNA ライブラリースクリーニングを行い、以下の①と②を評価基準とした。①shRNA は、DMSO 処理群と比べて G007-LK 処理群で細胞数を 17%以上減少させるもの、②遺伝子は、ひとつの遺伝子のもつ shRNA のうち、①を満たす shRNA が 60%以上であったもの、である。①と②を満たすものとして得られた候補遺伝子は、11 種類であった。細胞に、候補遺伝子の siRNA と G007-LK を 5 日間処理し、G007-LK に対する感受性の変化を検討した。その結果、遺伝子 X に対する siRNA を導入すると、G007-LK、IWR-1 に対する感受性が増強することを見出した。

更に、shRNA を用いて、遺伝子 X の発現を恒常的に抑制した細胞株 sh*GeneX* #1~#3 株を樹立した。HeLa 細胞の sh*GeneX* #1~#3 株では、scramble shRNA 株と比較して、G007-LK に対する感受性が約 2~10 倍増強した。また、COLO-320DM 細胞の sh*GeneX* #1~#3 株においては、scramble shRNA 株と比較して、G007-LK では 2~10 倍、IWR-1 では 15~21 倍感受性が増強した。一方、PARP1/2 阻害剤である olaparib、veliparib では感受性増強効果は認められなかった。また、遺伝子 X の shRNA 導入時のタンキラーゼ阻害剤への感受性増強は、他の 3 種類のヒト大腸がん細胞株でも観察された。

(2) 遺伝子 X を再発現させることによる感受性増強効果の消失の確認

前項 (1) で述べた感受性増強効果は、使用した shRNA 分子に固有のオフターゲット効果による偽陽性である可能性も考えられた。そこで、この可能性を排除するために以下の実験を行うこととした。異なる配列の sh*GeneX* #2 plasmid と sh*GeneX* #3 plasmid に対してそれぞれ耐性変異を施した遺伝子 X の発現ベクターを構築した。COLO-320DM 細胞の sh*GeneX* #2 株、sh*GeneX* #3 株にこれを恒常的に発現させた亜株 (遺伝子 X 再発現株) を樹立した。各遺伝子 X 再発現株において、G007-LK と IWR-1 それぞれに対して、scramble shRNA 株と同程度までもしくは耐性方向に抵抗性を獲得することを確認した。

(3) *in vivo* xenograft 試験

COLO-320DM 細胞の sh*GeneX* #3 株と scramble shRNA 株をそれぞれ NOD/SCID マウスに移植し、G007-LK 投与時の治療効果を検討した。腫瘍移植後 12 日目より 30 mg/kg の G007-LK を 1 日 1 回腹腔内投与した。Scramble shRNA 株移植群においては約 14%ほどの増殖抑制効果が確認された。一方、sh*GeneX* #3 株移植群においては約 65%の増殖抑制効果が確認された。この間にマウスの顕著な体重減少は認められず、死亡した個体もいなかった。また、タンキラーゼ阻害剤の薬力学的 (PD) マーカーとして、G007-LK 処理群から採剤された腫瘍では Axin2 の蓄積が認められた。また、G007-LK 投与群での Wnt/ β -catenin 経路下流標的遺伝子群の発現減少も認められた。

(4) 遺伝子 X の shRNA 導入が Wnt/ β -catenin 経路へ与える効果

Wnt/ β -catenin 経路への、遺伝子 X の shRNA 導入の影響を調べた。タンキラーゼ阻害剤の PD マーカーとして、G007-LK 処理時の Axin2 タンパク質の蓄積と Active β -catenin タンパク

質の減少を確認した。その結果、COLO-320DM 細胞と HCC2998 細胞の sh*GeneX* #2、 #3 株において、scramble shRNA 株と比較して、これらのマーカー変動の増強は認められなかった。更に、Wnt/ β -catenin 経路の下流標的遺伝子である *AXIN2* と *MYC* の減少を mRNA レベルで確認した。その結果、COLO-320DM 細胞と HCC2998 細胞の sh*GeneX* #2、 #3 株において、scramble shRNA 株と比較して、*AXIN2* と *MYC* の mRNA レベルには影響が認められなかった。

(5) 種々のがん細胞株を用いた遺伝子 X の shRNA 導入時の G007-LK 感受性試験

乳がん、胃がん、卵巣がんなどを含む大腸がん以外の種々の細胞株に対し、scramble shRNA 株、sh*GeneX* #2、 #3 株を樹立し、G007-LK に対する感受性試験を行った。その結果、大腸がんのみならず、他の組織由来のがん細胞株においても、sh*GeneX* #2、 #3 株は scramble shRNA 株と比較して、G007-LK に対する感受性が増強した。

【第 2 部：考察と結論】

第 2 部の研究により、遺伝子 X の siRNA あるいは shRNA を導入すると、タンキラーゼ阻害剤に対する感受性が増強することが明らかになった。また、遺伝子 X を再発現させた実験の結果より、shRNA の効果はオフターゲットによるものではないことも示された。タンキラーゼ阻害剤は、これまで Wnt/ β -catenin 経路に増殖を依存する大腸がん細胞に効果を示すと考えられたが、第 2 部の研究より、種々のがん細胞においても効果を示すことが示唆された。遺伝子 X の発現抑制を介したタンキラーゼ阻害剤の効果増強は、本研究により初めて明らかにしたことである。

【主論文に関する原著論文】

Fujiwara C., Muramatsu Y., Nishii M., Tokunaka K., Tahara H., Ueno M., Yamori T., Sugimoto Y., Seimiya H., Cell-based chemical fingerprinting identifies telomeres and lamin A as modifiers of DNA damage response in cancer cells. *Scientific Reports* (2018) Oct 4;8(1):14827